Trametes velutina JS18 유래 멜라닌 탈색 효소의 생산, 정제 및 특성

전승중^{1,2*}, 김태윤¹

¹동의대학교 바이오응용공학부 의생명공학전공

²동의대학교 스마트바이오헬스학과

Received: May 11, 2020 / Revised: June 9, 2020 / Accepted: June 17, 2020

Production, Purification and Characterization of a Melanin Bleaching Enzyme from *Trametes velutina* JS18

Sung-Jong Jeon^{1,2*} and Tae-Yun Kim¹

¹Biomedical Engineering and Biotechnology Major, Division of Applied Bioengineering, ²Department of Smart-Biohealth, Dong-Eui University, Busan 47340, Republic of Korea

The JS18 strain was isolated from an old tree forest and produced extracellular enzymes that decolorize synthetic melanin. Phylogenetic analysis, based on the internal transcribed spacer (ITS) sequence, indicate that JS18 belongs to the *Trametes velutina* species. JS18 demonstrated laccase activity but no manganese peroxidase or lignin peroxidase activity. Batch culture indicated that the melanin decolorization activity of JS18 strain originated from the laccase. Syringic acid and CuSO₄ induced maximum laccase production, yielding 98 U/mL laccase activity after cultivation for 7 days at 25 °C. *T. velutina* secretes an extracellular laccase in GYP medium, and this enzyme was purified using (NH₄)₂SO₄ precipitation, Hi-trap Q Sepharose columns and gel filtration. The molecular weight of the purified enzyme was estimated to be 67 kDa using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. This enzyme produced 80% of its melanin decolorization activity within the first 24 h of evaluation in the presence of 1-hydroxybenzotriazole (HBT), while only about 4% of the melanin was decolorized in the absence of the mediator. The greatest decolorization was observed at 1.5 mM/l HBT, which decolorized 81% of the melanin within the first 24 h. The optimum pH and temperature for this decolorization were found to be 5.0 and 37 °C, respectively. Our results suggest the possibility of applying HBT induced *T. velutina* JS18 laccase-catalyzed melanin decolorization.

Keywords: Melanin, decolorization, *Trametes velutina*, laccase

서 론

멜라닌은 다양한 생명체에 널리 존재하는 바이오폴리머로서 광보호, 열조절, 자유라디칼 억제, 양이온 착화합물, 항생 물질 등의 생물학적 기능을 수행한다[1]. 곰팡이에서는 극한 환경에 대한 세포 저항성을 증가시키고[2], 식물에서는 진균 증 발병에 관여하는 것으로 보고되었다[3]. 또한 식물 및 곤충에서는 각각 세포벽 성분과 표피층의 중요한 강화 요소로도 작용한다[4]. 사람의 멜라닌은 흑색 및 갈색의 eumelanin

과 적황색을 띠는 pheomelanin의 2가지 형태로 나뉘고, 머리카락과 피부에 주로 존재하는 멜라닌은 과도한 빛을 차단하고 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할을 수행하지만 과잉 생산된 멜라닌은 피부 노화 및 피부암을 유발하는 것으로 밝혀져, 이에 대한 연구가 진행 중이다[5].

최근에 피부 미백은 화장품 분야에서 많은 연구가 진행되었고, 멜라닌의 생합성 대사에서 가장 중요한 역할을 수행하는 tyrosinase의 활성을 억제하는 방향으로 연구가 집중되었다[6–9]. 그러나 tyrosinase 저해제들은 멜라닌 생성 억제작용 외에 피부 염증, 영구 색소 탈색, 외인성 갈색증 등의 심각한 부작용을 동반하는 것으로 알려졌다[10–12]. 따라서 다른 대안으로 이미 생성된 멜라닌 색소를 직접 분해하는 방법이 대두되었다. 비록 멜라닌은 매우 안정한 화합물이고 난

*Corresponding author

Tel: +82-51-890-2278, Fax: +82-505-182-6897

E-mail: jeon.sj@deu.ac.kr

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

분해성이지만, 몇몇 곰팡이 유래의 효소들이 멜라닌을 분해하는 것으로 보고되었다. *Phlebia radiata* BP-11-2 [13] 및 *Lentinus polychrous* Lév [14] 유래의 laccase는 각각 합성 멜라닌 및 곰팡이 유래 멜라닌을 분해하였고, *Ceriporiopsis* sp. MD-1 [15] 및 *Geotrichum* sp. [16] 유래의 manganese peroxidase는 사람 머리카락 유래의 천연 멜라닌을 탈색하는 것으로 보고되었다. *Phanerochaete chrysosporium* 유래 lignin peroxidase [17]와 *Sporotrichum pruinosum* 유래 melanin-bleaching enzyme [18]는 합성 멜라닌을 탈색하는 것으로 보고되었다. 이와 같이 멜라닌을 탈색하는 효소는 laccase, manganese peroxidase 및 lignin peroxidase의 3종류로 나눌 수 있고, 효소에 따라 탈색되는 멜라닌의 종류는 합성 및 천연 멜라닌으로 구분할 수 있다. 사람 유래의 천연 멜라닌은 합성 멜라닌의 구조에는 없는 지방족 탄소 (aliphatic carbon)가 존재하고, 단백질과 공유결합을 형성하고 있기 때문에 합성 멜라닌과는 조금 다른 구조를 가지고 있다[19].

본 연구에서는 사람 머리카락 유래의 천연 멜라닌 및 합성 멜라닌에 대하여 탈색 효능을 나타내는 새로운 진균류를 선별하고, 진균류가 생산하는 멜라닌 탈색효소의 생산, 정제 및 특성에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

멜라닌 탈색 균주의 screening

경상남도 삼립 지역의 토양, 썩은 나무 등에서 채취한 100여개의 샘플을 phosphate buffered saline (PBS)와 혼합한 후 1.0×10^5 까지 순차적으로 희석하고, ampicillin (100 µg/ml)이 첨가된 potato dextrose agar (PDA) 평판배지 상에 접종하여 25℃에서 3-5일간 배양하였다. 총 132종의 분리된 진균류에서 멜라닌 탈색능을 가진 균주를 선별하기 위하여 배양된 PDA 평판배지 상의 균사를 직경 5 mm의 cork borer로 agar plug를 만들어 human hair melanin (0.6 g/l)을 첨가한 malt extract dextrose broth (MDB) 배지(glucose 4 g/l, malt extract 10 g/l, peptone 4 g/l, agar 15 g/l)에 접종하고 25℃에서 120 rpm으로 1-2주간 배양하였다. 투명환을 형성한 균주는 동일한 배지에 계대 배양하여 4℃에 보관하였고, 이후 분석시험에 이용하였다.

균주 동정

분리된 균주를 동정하기 위하여 Internal transcribed spacer (ITS) 염기서열을 분석하였다. 분리된 균주를 Potato dextrose broth (PDB) 배지에 접종하고 25℃에서 120 rpm으로 7-10일 동안 배양한 후, 배양액을 membrane filter (pore size, 7 µm)을 이용하여 곰팡이 균사를 거른 뒤 멸균 증

류수로 3회 반복하여 씻어 내었다. Genomic DNA 추출은 GenEx Genomic DNA extraction kit (Gene All, Korea)를 이용하였으며, ITS 영역의 증폭은 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 프라이머를 사용하였다. PCR 반응은 pre-denaturation (95℃, 5 min), denaturation (94℃, 1 min), annealing (58℃, 30 sec), extension (72℃, 1 min 30 sec) 과정을 35회 실시하고, 최종적으로 72℃, 10 min 동안 반응하여 rDNA-ITS 영역을 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.0% agarose 상에서 전기영동하여 UV illuminator에서 확인하였으며, Gel SV Kit (Gene All)를 이용하여 정제한 후에 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 cloning하여 ABI3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 분석하였다.

Human hair melanin 추출법

천연 melanin은 사람 머리카락으로부터 분리하였다. 머리카락(15 g)을 작은 조각으로 자르고 1 M NaOH 500 ml를 첨가하고 24시간 stirrer로 교반 하였다. 혼합물은 원심분리 (2400 ×g 15 min)한 후, 갈색의 상등액을 회수하고 0.1 M HCl를 첨가하여 pH를 감소시키면서 멜라닌 침전을 형성하였다. 침전물은 원심분리(2400 ×g 15 min)한 후, 0.1 M HCl로 washing하고 2 M NaOH를 첨가하여 중화하였고 다시 6 M HCl를 첨가하여 원심분리(2400 ×g 15 min) 하였다. 이 과정은 상등액의 색깔이 없어질 때까지 약 5번 반복하였다. 마지막 침전물은 6 M HCl에 6시간 동안 stirrer로 교반 한 후 원심분리(2400 ×g 15 min) 하여 상등액을 제거하였다. 침전물은 ethanol로 wash한 후 methanol에 용해시키고 evaporator로 완전히 건조시켜 실험에 사용하였다.

효소의 최적생산조건

JS18 균주를 MDB 평판배지 상에 접종하여 25℃에서 120 rpm으로 5일 동안 배양한 후 한천배지 상의 균사를 직경 5 mm의 cork borer로 agar plug를 만들어 50 ml의 GYP 배지(Glucose 20 g/l, Yeast extract 5 g/l, Peptone 5 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/l, pH 5.0)에 접종하고 25℃에서 130 rpm으로 5일 동안 전배양하였다. 5일된 전배양액을 laccase inducer (0.5 mM $CuSO_4$, 1 mM syringic acid)가 첨가된 1 l의 GYP 배지에 접종하고 25℃에서 130 rpm으로 7일 동안 본배양하였다. 또한, 균주를 접종하지 않은 GYP 배지에 1 mM syringic acid 및 0.5 mM $CuSO_4$ 를 단독 또는 동시에 첨가하고 동일조건에서 7일간 배양한 후 laccase 활성을 측정하여 대조구 값으로 설정하였다.

효소활성측정

JS18 균주의 배양액을 membrane filter (pore size,

7 μm)을 통과시켜 균사체를 제거하고 다시 membrane filter (pore size, 0.45 μm)을 통과시켜 불순물을 완전히 제거하였다. 여과한 배양액은 ultrafiltration 장치 (Centricon, MWCO 10 kDa)을 사용하여 농축하였고 이 용액을 조효소액으로 사용하였다. Laccase 활성은 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5)에서 2 mM 2,2'-azino bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS)을 기질로 사용하여 37°C에서 10분간 조효소와 반응시켰으며, ABTS의 산화에 의해 생성된 산화물은 420 nm ($\epsilon_{\text{max}} = 36,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)에서 측정하였다. Manganese peroxidase 활성은 반응액 0.9 ml (50 mM sodium malonate buffer (pH 4.5), 0.5 mM MnSO_4 , 0.1 mM H_2O_2)에 조효소액 0.1 ml를 첨가하여 37°C에서 10 분간 반응시킨 후, 생성된 Mn^{3+} -malonate complex를 흡광도 270 nm ($\epsilon = 11,590 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)에서 측정하였다[20]. Lignin peroxidase 활성은 반응액 0.9 ml (50 mM sodium malonate buffer (pH 4.5), 2 mM veratryl alcohol, 0.1 mM H_2O_2)에 조효소액 0.1 ml를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 생성된 veratraldehyde를 흡광도 310 nm에서 측정하였다[21]. 효소활성의 단위는 분당 1 μM 의 기질을 산화시키는 효소의 양을 1 unit (U)로 정의하였다.

효소 정제

JS18 균주의 배양액을 membrane filter (pore size, 7 μm)을 통과시켜 균사체를 제거하고 원심분리(10,000 $\times g$, 10 min)한 후 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액은 포화농도 80%로 ammonium sulfate를 첨가하고 4°C에서 2시간 방치한 후 원심분리(10,000 $\times g$, 20 min) 하였다. 원심분리 한 후 침전물은 buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM CuSO_4)에 녹인 후 같은 buffer로 24시간 투석하였다. 투석한 단백질을 ÄKTAprime (GE Healthcare)을 이용하여 HiTrap Q HP column에 loading한 후 0–1.0 M의 NaCl로 농도구배를 주어 결합된 단백질을 용출하였다. 용출된 희분은 멜라닌 탈색 활성을 측정하여 활성이 있는 희분을 모아 Amicon centricon-10 filter (Milipore)로 농축한 다음 buffer B (50 mM sodium phosphate, pH 6.0, 150 mM NaCl)로 투석하였다. 투석한 용액은 SuperdexTM 200 column (GE Healthcare)에 로딩한 후 buffer B로 용출하고 멜라닌 탈색 활성을 측정하여 활성이 있는 희분을 모아 Amicon centricon-10 filter (Milipore)로 농축하였다. 단백질의 정제도는 SDS-PAGE (10% acrylamide gel)을 통하여 확인하였고, 전기영동 밴드는 coomassie를 사용하여 염색하였다.

멜라닌 탈색 측정

Human hair melanin의 경우 수용액에서 침전을 자주 형성하기 때문에 분광학적 효소 활성 측정에 적합하지 않아 멜

라닌 탈색 활성에는 합성 멜라닌(Sigma)을 사용하였다. 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) 0.7 ml, 합성멜라닌 (0.2 mg/ml) 0.1 ml, 효소 (100 U/ml) 0.1 ml의 용액에 redox mediator로서 10 mM 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HBT), ABTS, syringaldehyde, vanillic acid, t-butylhydroquinone (TBHQ), kojic acid를 각각 0.1 ml씩 첨가하여 37°C에서 24시간 반응하였다. 멜라닌의 탈색율은 540 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 공식에 따라 구하였다[14].

$$\text{탈색율 (\%)} = \frac{[(\text{개시 흡광도값}) - (\text{반응 종결 후 흡광도값})]}{(\text{개시 흡광도값})} \times 100.$$

결과 및 고찰

멜라닌 탈색 균주의 분리

경상남도 삼립 지역의 토양, 고목 등에서 채취한 132종의 진균류에 대하여 사람 머리카락 유래 천연 멜라닌을 첨가한 MDB 고체 배지상에서 균사체를 배양하고, 투명환을 형성하는 균주를 선별하였다. 그 결과 고목에서 분리한 진균류 1종에서 투명환이 확인되었다(Fig. 1). 투명환을 형성한 균주를 동정하기 위하여 Internal transcribed spacer (ITS) 염기서열을 분석하고 BLAST program을 이용하여 상동성을 분석한 결과 100%의 신뢰도로 *Trametes velutina*로 동정되어 본 균주를 *Trametes velutina* JS18로 명명하였다(Fig. 2).

멜라닌 탈색 효소의 동정

멜라닌 탈색 반응은 곰팡이 유래의 laccase [18], manganese peroxidase [15], lignin peroxidase [17] 중 한가지 효소에 의해 촉매되는 것으로 알려져 있다. *T. velutina* JS18의 균사체로부터 멜라닌 탈색에 관여하는 효소를 동정하기 위하여 JS18균주를 GYP 배지에 접종하고 25°C에서 7일간 배양한 후 배양 상등액을 대상으로 laccase, manganese peroxidase,

Fig. 1. Activity of melanin decolorization by *T. velutina* JS18. Mycelia of *Trametes velutina* JS18 were cultivated on MDB agar medium containing 0.06% human hair melanin. (A) Black color zone before cultivation. (B) Clear zone after 20 day of cultivation.

Fig. 2. Phylogenetic position of strain JS18 in the genus *Trametes* based on the Internal transcribed spacer partial sequences. (A) Internal transcribed spacer (ITS) partial sequence of strain JS18. (B) Phylogenetic tree. The tree was constructed using the neighbor joining method. The bar represents 0.005% sequence divergence. The words in parentheses indicate the genbank accession number.

lignin peroxidase 활성을 조사하였다. 그 결과 *T. velutina* JS18의 배양 상등액에서 manganese peroxidase 및 lignin peroxidase 활성은 나타나지 않았고, laccase의 기질에 대한 활성(8 unit/ml)만 확인되었다. 따라서, *T. velutina* JS18의 경우 배양액 중에 생산된 laccase가 멜라닌 탈색 활성을 나타내는 것으로 예상되었다. Laccase는 종류별로 다양한 기질 특이성을 가지고 있기 때문에 곰팡이에서만 약 100여종 이상의 종류가 보고 되었지만[22], 현재까지 멜라닌을 탈색시키는 laccase는 *Phlebia radiata* BP-11-2 [13], *Lentinus polychrous* Lév [14], *Trametes versicolor* [23] 및 *Phenophora* sp. JS17 [24]의 4종의 진균류에서만 보고되었다.

멜라닌 탈색 효소의 생산 및 정제

Yang 등의 선행 연구에서 *T. velutina* 5930 유래 laccase는 배양 배지에 laccase inducer로써 1 mM syringic acid 및 0.5 mM CuSO_4 를 동시에 첨가할 경우 laccase 생산량이 매우 증가하는 것으로 보고된 바 있다[25]. 본 연구의 *T. velutina* JS18의 경우에도 같은 laccase inducer가 laccase 생산 유도 효과를 갖는지 확인하기 위하여 GYP 배지에 1 mM syringic acid 및 0.5 mM CuSO_4 를 단독 또는 동시에 첨가하고 7일 동안 배양하면서 *T. velutina* JS18의 배양 상등액을 대상으로 laccase 활성을 측정하였다. 그 결과 1 mM syringic acid 및 0.5 mM CuSO_4 를 단독으로 첨가한 경우에

는 대조구와 비교하여 laccase 활성이 각각 5배 및 4배씩 증가하였고, 동시에 첨가한 경우에는 대조구와 비교하여 12배 활성이 증가하였다(Fig. 3). JS18 균주의 laccase 최대 활성

Fig. 3. Effect of metal ion and aromatic compound on the extracellular enzyme production in *T. velutina* JS18. Time course of laccase activity in extracellular fluid of *T. velutina* JS18 culture without (◆) and with 1 mM syringic acid (■), 0.5 mM Cu^{2+} (▲), and both 1 mM syringic acid and 0.5 mM Cu^{2+} (●). The data presented are the average values from triplicate repeats of measurements.

Fig. 4. SDS-PAGE of the purified enzyme. SDS-PAGE of the purified enzyme after Coomassie brilliant blue staining. Lane 1, molecular mass marker; lane 2, the purified laccase.

은 98 U/ml을 나타내었고, 기존 보고된 *Trametes versicolor* 유래 laccase의 활성(11.4 U/ml) [26]과 *Trametes hirsuta* 유래 laccase의 활성(31.7 U/ml) [27]과 비교하여 매우 높은 것으로 확인되어 본 균주는 다른 *Trametes* 속 균주보다 laccase 생산량이 우수하였다. 구리 이온은 laccase의 보결분자단(prosthetic group)으로 알려져 있고, laccase 생산에 있어 방향족 화합물은 laccase isozyme의 분비율 향상, laccase 유전자의 전사 유도, 세포 외 단백질 분해활성의 감소에 기여하는 것으로 보고된 바 있다[25]. JS18 균주를 GYP 배지에 laccase inducer (0.5 mM CuSO₄, 1 mM syringic acid)를 첨가하고 7일동안 배양한 후, 배양 상등액의 효소를 ammonium sulfate 침전, 음이온 교환수지 및 gel filtration chromatography을 이용하여 정제하였다. 정제된 효소를 SDS-PAGE로 확인한 결과 약 67 kDa 부근에서 밴드가 확인되었다(Fig. 4). 또한, Superdex™ 200 column을 이용한 gel filtration 분석 결과 약 69 kDa의 분자량을 나타내어 정제된 효소는 monomeric enzyme를 형성하는 것으로 확인되었다(data not shown). 지금까지 보고된 *Trametes* 속 유래의 laccase는 60–70 kDa 사이의 분자량을 나타냈고[22], *T. velutina* JS18의 배양액에서 정제한 효소의 분자량도 이 범주 안에 속하는 것으로 확인되었다.

Fig. 5. Effect of redox mediator type and concentration on the melanin decolorization by purified enzyme. (A) Decolorization of melanin by the purified enzyme in the absence (control) and in the presence of HBT, ABTS, Syringaldehyde, Vanillic acid, TBHQ or Kojic acid as redox mediator at 37 °C for 24 h. (B) Time course of melanin decolorization rate by the purified enzyme after addition of different concentrations of HBT such as 0 mM HBT (●), 0.25 mM HBT (○), 0.5 mM HBT (▲), 1 mM HBT (△), 1.5 mM HBT (■), and 2.0 mM HBT (□) at 37 °C for 24 h. The data presented are the average values from triplicate repeats of measurements.

Redox mediator의 영향

곰팡이 유래 Laccase의 분자량은 대부분 59–100 kDa으로 크기가 크고[22] 주로 단일 기질의 phenolic 부분만 산화할 수 있어 lignin 및 melanin과 같은 복잡한 거대구조의 난분해성 물질을 단독으로 분해하기에는 효율이 많이 떨어진다. 따라서, laccase와 더불어 redox mediator가 함께 존재하면 hydroxyl radical이 생성되고 이것이 nonphenolic compound까지 산화할 수 있기 때문에 난분해성 물질의 분해 효율이 상

승할 수 있다. *T. velutina* JS18로부터 정제한 효소에 대하여 멜라닌 탈색 활성을 조사하기 위해 정제된 효소와 합성 멜라닌을 37°C에서 24시간 반응하였고, 여기에 다양한 redox mediator를 첨가하여 멜라닌 탈색율을 조사하였다. 그 결과 효소 단독으로 합성 멜라닌과 반응한 경우에는 단지 4%만이 탈색되는 반면, 1 mM HBT를 mediator로 첨가한 경우에는 탈색율이 80%로 향상되었다(Fig. 5A). 그 외에 ABTS와 syringaldehyde를 첨가한 경우에는 멜라닌 탈색율이 8%로 소량 상승하였고, 다른 mediator에 대해서는 탈색율에 거의 변화가 없었다(Fig. 5A). *Peniophora* sp. JS17 유래의 laccase는 HBT의 존재 하에서 멜라닌 탈색율이 77%로 향상되었고[24], *Lentinus polychrous* Lév 유래의 crude laccase는 ABTS의 존재 하에서 멜라닌 탈색율이 87%로 상승한다고 보고되었다[14]. Xu 등은 Laccase가 촉매하는 paper pulp 탈색반응과 polycyclic hydrocarbon의 분해반응에서 N-OH기를 가진 HBT 화합물은 laccase와의 산화환원전위 (redox potential) 차이가 크면 클수록 기질에 대한 산화율이 높기 때문에 촉매 활성이 향상된다고 보고하였다[28]. 따라서, *T. velutina* JS18 유래 laccase도 다른 redox mediator보다 N-OH기를 가진 HBT와의 산화환원전위 차이가 커서 멜라닌 탈색율이 향상된 것으로 추측되었다.

본 효소의 HBT 농도에 따른 멜라닌 탈색율의 변화를 알아보기 위하여 다양한 농도의 HBT를 첨가하고 탈색율을 조사한 결과, 1.5 mM HBT 농도에서 24시간 만에 81%의 탈색율을 나타냈고, 2 mM HBT의 농도에서는 조금 더 낮은 73% 탈색율을 보여 본 효소의 멜라닌 탈색을 위한 HBT의 최적 농도는 1.5 mM로 확인되었다(Fig. 5B). 이와 같이 멜라닌 탈색은 효소 단독으로는 효율이 낮기 때문에 mediator의 종류 및 농도에 따라 멜라닌 탈색율이 크게 달라질 수 있음을 확인하였다.

최적 pH 및 온도

정제된 멜라닌 탈색 효소의 pH 및 온도에 대한 영향을 알아보기 위하여 다양한 pH 및 온도 조건에서 1.5 mM HBT 및 합성 멜라닌과 함께 24시간 반응하고 멜라닌 탈색 활성을 조사하였다. 본 효소의 멜라닌 탈색에 대한 최적 pH는 5.0으로 80%의 탈색율을 보였고, pH 4.0–6.0의 범위에서 70% 이상의 탈색율을 나타냈다(Fig. 6A). 그러나 pH 3.5 이하에서는 멜라닌 탈색율이 20% 이하로 급격히 감소하였다(Fig. 6A). *Lentinus polychrous* Lév 유래의 crude laccase는 ABTS와 함께 한 멜라닌 탈색 반응 결과, pH 5.0–6.5의 범위에서 70% 이상의 탈색율을 나타낸다고 보고된 바 있어 본 효소의 결과와 유사하였다[14]. 한편, 본 효소의 멜라닌 탈색에 대한 최적온도는 37°C로 나타났고, 30–60°C 범위에서 멜라닌 탈색율이 70% 이상을 유지하였다(Fig. 6B). 이 결과와

Fig. 6. pH and temperature profile for melanin decolorization by the purified enzyme in the presence of HBT (1.5 mM). (A) pH dependence of melanin decolorization. (B) Temperature dependence of melanin decolorization. The data presented are the average values from triplicate repeats of measurements.

유사하게 *Lentinus polychrous* Lév 유래 crude laccase의 멜라닌 탈색에 대한 최적온도는 35°C이었고, 30–60°C 범위에서 60% 이상의 멜라닌 탈색율을 유지하는 것으로 보고되었다[14].

본 연구 결과에서 *T. velutina* JS18의 배양액으로부터 정제한 효소는 HBT와 함께 멜라닌을 효율적으로 탈색하는 것으로 확인되었고, 미백 화장품 원료로서의 적용 가능성을 시사하였다. 그러나 HBT는 폭발 위험 물질로 분류되어 있어 화장품 원료로 적합하지 않기 때문에 현재, 인체에 적합한 mediator의 탐색 및 개발을 추가로 진행 중에 있다.

요약

삼림지역의 고목에서 분리한 JS18 균주는 합성 멜라닌을 탈색하는 세포 외 분비효소를 생산했다. JS18 균주의

internal transcribed spacer (ITS) 염기서열을 분석하고 계통학적으로 확인한 결과 본 균주는 *Trametes velutina*로 동정되었다. JS18 균주는 laccase 활성을 나타냈지만 manganese peroxidase 및 lignin peroxidase 활성은 나타내지 않았다. 본 균주를 회분배양한 결과 멜라닌 탈색 활성은 laccase 활성으로부터 유래하는 것으로 확인되었다. Laccase 유도인자로써 Syringic acid 및 CuSO₄를 첨가하고 25℃에서 7일간 배양한 결과 배양상등액에서 98 U/ml의 laccase 활성을 나타내었다. GYP 배지에서 배양한 *T. velutina*의 배양상등액에서 ammonium sulfate 침전, Hi-trap Q Sepharose 컬럼 및 gel filtration을 이용하여 효소를 정제하였고, SDS-PAGE에서 약 67 kDa의 분자량을 나타내었다. 정제된 효소의 멜라닌 탈색율은 효소 단독으로는 24 시간 만에 단지 4% 만을 나타내는 반면, HBT의 존재 하에서는 80%로 향상되었다. 또한 1.5 mM HBT의 농도에서는 최대 81%의 멜라닌 탈색율을 나타내었다. 본 효소의 멜라닌 탈색에 대한 최적 pH 및 온도는 각각 5.0와 37℃를 나타내었다. 본 연구에서는 *T. velutina* JS18 유래 laccase가 촉매하는 멜라닌 탈색 반응에서 redox mediator로써 HBT의 적용 가능성을 확인하였다.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Lin WP, Lai HL, Liu YL, Chiung YM, Shiau CY, Han JM, et al. 2005. Effect of melanin produced by a recombinant *Escherichia coli* on antibacterial activity of antibiotics. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **38**: 320-326.
- Butler MJ, Day AW. 1998a. Destruction of fungal melanins by ligninases of *Phanerochaete chrysosporium* and other white rot fungi. *Int. J. Plant Sci.* **159**: 989-995.
- Butler MJ, Day AW. 1998b. Fungal melanins: a review. *Can. J. Microbiol.* **44**: 1115-1136.
- Riley PA. 1997. Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**: 1235-1239.
- Henson JM. 2001. Melanin, pp. 229-246. In M. Hofrichter and A. Steinbuechel (ed.), *Biopolymers*, Vol.1, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
- Terao M, Tomita K, Oki T, Tabe L, Gianni M, Garattini E. 1992. Inhibition of melanogenesis by BMY-28565, a novel compound depressing tyrosinase activity in B16 melanoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **43**: 183-189.
- Boissy RE, Visscher M, De Long MA. 2005. DeoxyArbutin: a novel reversible tyrosinase inhibitor with effective in vivo skin lightening potency. *Exp. Dermatol.* **14**: 601-608.
- Kim YJ, Uyama H. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol. Life Sci.* **62**: 1707-1723.
- Rendon MI, Gaviria JI. 2005. Review of skin-lightening agents. *Dermatologic Surgery* **31**: 886-890.
- Matsubayashi T, Sakaeda T, Kita T, Kurimoto Y, Nakamura T, Nishiguchi K, et al. 2003. Intradermal concentration of hydroquinone after application of hydroquinone ointments is higher than its cytotoxic concentration. *Biol. Pharm. Bull.* **26**: 1365-1367.
- Del Giudice P, Yves P. 2002. The widespread use of skin lightening creams in Senegal: a persistent public health problem in West Africa. *Int. J. Dermatol.* **41**: 69-72.
- Al-Saleh I, Shinwari N, El-Doush I, Billedo G, Al-Amodi M, Khogali F. 2004. Comparison of mercury levels in various tissues of albino and pigmented mice treated with two different brands of mercury skinlightening creams. *Biometals* **17**: 167-175.
- Kaneko S, Cheng M, Murai H, Takenaka S. 2009. Purification and characterization of an extracellular laccase from *Phlebia radiata* strain BP-11-2 that decolorizes fungal melanin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 939-942.
- Khammuang S, Sarntinima R. 2013. Decolorization of synthetic melanins by crude laccases of *Lentinus polychrous* Lév. *Folia microbiologica* **58**: 1-7.
- Nagasaki K, Kumazawa M, Murakami S, Takenaka S, Koike K, Aoki K. 2008. Purification, characterization, and gene cloning of *Ceriporiopsis* sp. strain MD-1 peroxidases that decolorize human hair melanin. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 5106-5112.
- Kim BS, Blaghen M, Hong HS, Lee KM. 2013. Purification and characterization of a melanin biodegradation enzyme from *Geotrichum* sp. *Int. J. Cos. Sci.* **38**: 622-626.
- Woo SH, Cho JS, Lee BS, Kim EK. 2004. Decolorization of melanin by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **9**: 256-260.
- Mohorčič M, Friedrich J, Renimel I, Andre P, Mandin D, Chaumont JP. 2007. Production of melanin bleaching enzyme of fungal origin and its application in cosmetics. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **12**: 200-206.
- Hervé M, Hirschinger J, Granger P, Gilard P. 1994. A ¹³C solid-state NMR study of the structure and auto-oxidation process of natural and synthetic melanins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1204**: 19-27.
- Coconi-Linares N, Magaña-Ortiz D, Guzmán-Ortiz DA, Fernández F, Loske AM, Gómez-Lim MA. 2014. High-yield production of manganese peroxidase, lignin peroxidase, and versatile peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 9283-9294.
- Archibald FS. 1992. Lignin peroxidase activity is not important in biological bleaching and delignification of unbleached kraft pulp by *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3101-3109.
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 215-242.
- Cho JS. 2002. Studied on decoloration of melanin using laccase. Available from <http://dspace.inha.ac.kr/handle/10505/11037>.
- Son MJ, Kim YH, Nam SW, Jeon SJ. 2019. Optimization of Media

- Composition on the Production of Melanin Bleaching Enzyme from *Peniophora* sp. JS17. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **47**: 250-258.
25. Yang Y, Wei F, Zhuo R, Fan F, Liu H, Zhang C, *et al.* 2013. Enhancing the laccase production and laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes velutina* 5930 with great potential for biotechnological applications by different metal ions and aromatic compounds. *PLoS One* **8**: e79307.
26. Tavares APM, Coelho MAZ, Agapito MSM, Coutinho JAP, Xavier AMRB. 2006. Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. *Appl. Biochem. Biotech.* **134**: 233-248.
27. Rosales E, Couto SR, Sanromán MA. 2007. Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. *Enzy. Microb. Technol.* **40**: 1286-1290.
28. Xu F, Kulys JJ, Duke K, Li K, Krikstopaitis K, Deussen HJ, *et al.* 2000. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2052-2056.